



Szent István Egyetem
Biológia Tudományi Doktori Iskola

Kukorica csíkos mozaik vírus (MDMV) populációk köpenyfehérje génjeinek molekuláris elemzése

Doktori értekezés tézisei

Gell Gyöngyvér Mónika

Témavezetők: Dr. Balázs Ervin, MTA-MGKI
Dr. Hornok László, SZIE

Gödöllő - Martonvásár
2011

1 A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS A KITŰZÖTT CÉLOK

1.1 Problémafelvetés

Magyarország kukoricatermesztése nagy múltra tekint vissza, a spanyol kereskedők által Európába szállított kukorica (tengeri) a törököktől (törökbúza) került magyar lakta területekre, és azóta is meghatározó szerepe van mezőgazdaságunkban. Hazánk növénytermesztésére a gabonatúlsúly jellemző (50-70%). A gabonát termelő területeken belül a kukorica (25-30%) és a búza (18-30%) aránya a legjelentősebb. Magyarországon a kukorica a szántóföldi növények közül a legnagyobb területet foglalja el, szerepe a mezőgazdaságban meghatározó.

A kukorica terméshozamait nagyban befolyásolják a kártevők és kórokozók által okozott minőségi és mennyiségi veszteségek. Az egyik ilyen kórokozó, és egyben a kukorica legjelentősebb vírus betegsége a kukorica csíkos mozaik vírus (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV).

A *Potyviridae* családba tartozó kukorica csíkos mozaik vírust (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV), mely az egyszikű növények egyik legjelentősebb vírus kórokozója, először a hatvanas években regisztrálták az Egyesült Államokban (Janson és Ellett 1963, Williams és Alexander 1965), majd hamarosan hazánkban is leírták (Szirmai és Paizsné, 1963). Gazdanövényei a kukorica, fenyércirok, cukornád, köles, cirok fajok, valamint egyéb pázsitfű félék (Williams és Alexander 1965). Az MDMV maggal 0,007%- 0,4%-ban (Hill et al., 1974; Mikel et al., 1984), mechanikai úton, valamint levéltetvekkel nem perzisztens módon terjed (Toler, 1985).

A vírusfertőzésre a különböző kukoricafajták eltérő érzékenységet mutatnak, általánosan megfigyelhető a mozaik tünetek kialakulása, törpülés, gyengén fejlett címer és rosszul kötött termés (Revers et al., 1999). A vírusfertőzés komoly mezőgazdasági károkat okoz (Oertel et al., 1997), a terméskiesés elérheti a 42%-ot is (Peti, 1983; Sum et al., 1979; Szirmai, 1968). Figyelembe véve, hogy a fertőzöttség mértéke fajtánként akár 80% is lehet (Tóbiás et al., 2003), az MDMV kártétele gazdasági szempontból igen jelentős. A gazdasági kártétel az abortált végű csövek nagy számából, a csövek méretének csökkenéséből és az ezerszemtömeg csökkenéséből adódik össze (Toldiné Tóth É., 2008).

Míg az SCMV (*Sugarcane mosaic virus*) alcsoport más tagjait, az MDMV-vel szerológiai rokon, egyszikűeket fertőző vírusokat kutatók részletes vizsgálatoknak vetették alá, addig az MDMV jelentőségével kevesen foglalkoztak. Ezt támasztották alá a génbanki adatbázis adatai, ahol korlátozott számú MDMV szekvencia volt megatlálható. Mivel az alcsoport tagjai közül hazánkban az MDMV a domináns vírus, ezért indokolt a vírus szélesebb körű vizsgálata.

Az MDMV genetikai állományának változékonysága és ennek lehetséges patológiai következményei figyelmünket a vírus tüneti determinánsainak és populációjának részletesebb elemzésére irányította. A PDR (*pathogen derived resistance*) kísérletekben a vírusok

köpenyfehérje génjét vagy annak egy darabját széleskörben alkalmazzák vírusrezisztencia kiváltására. A köpenyfehérje multifunkcionális, fontos tüneti determináns és gazdaspecifitás meghatározó, valamint nélkülözhetetlen a levéltetvekkal való terjedéshez, elengedhetetlen a vírus sejtről-sejtre- valamint hosszútávú mozgásához. Mivel szerepe ilyen sokrétű, elsődleges szerkezetének meghatározása jól alkalmazható a vírus genetikai vizsgálatára.

1.2 Célkitűzések

A köpenyfehérje fentebb említett tulajdonságai miatt, vizsgálataink a köpenyfehérjét (CP- coat protein) kódoló régió összehasonlító analízisére terjednek ki.

Munkánk során a következő feladatokat tűztük ki doktori dolgozatom céljaul:

1. A doktori képzés ideje alatt (2006-2009) meghatározni a kukorica csíkos mozaik vírus (MDMV) rokonsági körét, két magyarországi kukorica termesztő – és nemesítő területről gyűjtött izolátumok köpenyfehérje génjének elsődleges szerkezete alapján, ezzel feltérképezni a hazai víruspopuláció összetételét, stabilitását.

2. MDMV köpenyfehérje génjét tartalmazó konstrukció készítése, mely a transzgénikus növényekben alkalmas vírus ellenállóság kiváltására. A transzformációs módszerek alapjainak kidolgozása.

3. Teljes hosszúságú, lehetőség szerint fertőzőképes MDMV klón előállítása.

2 ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Vírus izolátumok gyűjtése és felszaporítása

Mintáinkat négy egymást követő évben (2006-2009), két földrajzilag jól elkülönülő területről, a szegedi Gabonatermesztési Kht. tenyészkertjéből kukoricáról (*Zea mays* L. convar. *dentiformis*, *Zea mays* L. convar. *saccharata*), fenyércirokról (*Sorghum halepense* (L.) Pers) és szemes cirokról (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), valamint martonvásári tenyészparcellákról kukoricáról (*Zea mays* L. convar. *dentiformis*, *Zea mays* L. convar. *saccharata*), fenyércirokról (*Sorghum halepense* (L.) Pers) gyűjtöttük.

A tüneteket mutató levélmintákat 0,02 M nátrium-foszfát-pufferben (pH 8) homogenizáltuk, celittel elkevertük és a kapott présnedvvel a növényeket bedörzsöltük. Az inokuláláshoz 2-3 leveles fejlettségi stádiumban lévő csemegekukoricát (*Zea mays* L. convar. *saccharata*) 'Honey' használtunk. A levélmintákat további feldolgozásig -70 °C-on RNAlater oldatban (Ambion) tároltuk.

2.2 Pollen-életképesség vizsgálat

A fitotron kamrában nevelt MDMV fertőzött és kontroll kukorica növények pollen-életképességét FDA festéssel vizsgáltuk. A fluoreszcein diacetát képes átjutni a sejtmembránokon, miközben intracelluláris észterázok lehasítják róla a diacetát csoportot. Az ép membránnal rendelkező sejtekben felhalmozódik a fluoreszcein, így jelzi a sejtek életképességét. A növények címeréből anthérákat szedtünk, melyekből kipreparáltuk a pollent. A mikrospórákat 0,04 µg ml⁻¹ FDA koncentrációjú 0,3M mannitol oldatban vizsgáltuk (Widholm, 1972).

2.3 Molekuláris vizsgálatok

2.3.1 Mintafeldolgozás-RNS kivonás-Reverz transzkripció

A levelekből Qiagen RNeasy Plant Mini Kittel RNS- t vontunk ki, a kiindulási mennyiség 100 mg volt. A kinyert RNS minőségét gél-elektroforézissel ellenőriztük, mennyiségét pedig spektrofotometrikus úton határoztuk meg, majd a Fermentas cég RevertAid First Strand cDNA Synthesis kitjével (M-MuLV-reverz transzkriptáz), oligo dT₁₈ nukleotid primerrel reverz transzkripciót végeztünk. A reakcióelegyet a gyártó ajánlása szerint állítottuk össze.

A teljes hosszúságú klón esetében az átírandó szekvenciák hosszúsága miatt a cDNS RibonukleázH (Ambion) kezelése után, a reverz transzkripciót az Invitrogen cég Superscript III RT enzimével a gyártó ajánlása szerint végeztük.

2.3.2 Polimeráz láncreakciók

Az egyszálú cDNS-ből a PCR primer pár (MDMV 8198 fwd 5' AAA CCG GTG GYT RCT YGA ART GC 3'; MDMV3'- 5' ATC CTA GGT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GTC 3') a 3' nem kódoló régiót, a köpenyfehérjét kódoló régiót és az N1b mintegy 323 bp hosszúságú szakaszát szaporította fel (~1317 bp).

A polimeráz láncreakcióhoz egységesen 40:1 arányú Taq:Pfu polimeráz enzimkeveréket használtunk. A klónozott vírus fragmentumok szekvenálását a Biomi Kft. végezte, M13 forward, M13 reverse és az amplifikáló primerekkel.

A teljes hosszúságú klón esetében a szekvenciák hosszúsága miatt a ROCHE cég Expand Long Template enzim keverékét használtuk. A teljes vírusgenomot két részletben szaporítottuk fel. Az első szakasz az 5'-4446-ig (4446bp), a második szakasz 4105-poly adenilációs szignál-ig tart (5400bp).

2.3.3 A köpenyfehérje gének klónozásának lépései

A PCR-rel felszaporított és gélből visszaizolált DNS fragmentumokat pLitmus28i (2823 bp, New England BioLabs) vektor *AgeI-XmaI* klónozó helyére illesztettük be, a vektort minden esetben foszfátazzal kezeltük (Fermentas-SAP-Shrimp Alkaline Phosphatase). A klónozások során a Fermentas cég restrikciós endonukleázait használtuk. A ligátumokat *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd kék-fehér szelekcióval választottuk ki az inszertet tartalmazó klónokat. A valóban pozitívnak bizonyult minták bázissorrendjét M13for és M13 rev primerekkel meghatároztuk.

2.3.4 Transzformációs módszerek

Az *E. coli* sejtek transzformálását Inoue módszere szerint végeztük (1990). A kompetens sejt szuszpenzió 50µl-enként folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd -70 °C-on fagyasztva tároltuk. Transzformáció után a sejteket folyékony SOC táptalajban egy órán keresztül 37 °C-on 200 rpm-en rázattuk, majd a szelekciós markernek megfelelő antibiotikummal kiegészített szilárd LB táptalajra szélesztettük. Amennyiben a vektor konstrukció a kék-fehér szelekciót lehetővé tette, a szilárd táptalajra 10µl 1 M izopropil-tio-β-D-galaktozidot (IPTG) és 40µl 20mg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozidot (X-gal) szélesztettünk. Ezt követte egy egész éjszakás, 37 °C-on végzett inkubáció. A TOPO-XL, illetve TOPO-TA vektorral való transzformálások esetében nem volt szükség kék-fehér szelekcióra, mert ezek a vektorok tartalmazzák a *ccdB* gént a LacZ fragment C-terminális részén. Ha a kívánt szekvencia beépül, elrontja az amúgy letális *ccdB* gént, ennél fogva csak a sikeresen ligálódott vektorokat tartalmazó baktériumok képesek életben maradni.

A pAHC20-UbiCPiPC növényi transzformációs vektort Höfgen és Willmitzer (1988) módszere alapján juttatuk be *Agrobacterium tumefaciens* sejtekbe, annyi módosítással, hogy csak egy napot növesztettük szilárd táptalajon, valamint az antibiotikum koncentrációt többszörösére emeltük, a baktérium (Agl1) alacsony antibiotikum érzékenysége miatt.

2.4 A klónozások során használt vektorok, baktériumok és táptalajok

A filogenetikai vizsgálatok során az MDMV köpenyfehérje génjét pLitmus28i (New England BioLabs) vektorba klónoztuk.

Az MDMV csonkított köpenyfehérje génjét tartalmazó konstrukció elkészítéséhez pLitmus28i (New England BioLabs), pBluescriptKSII+ (Fermentas), pAct1F (McElroy et al., 1991) valamint pAHC20 (Christensen et al., 1996) vektorkat használtunk.

A teljes hosszúságú MDMV klón előállításához a PUC19 (Fermentas), TopoXL (Invitrogen), TopoTA (Invitrogen) plazmidokat alkalmaztuk.

A klónozásokhoz szükséges NOS terminátort (nopaline synthase terminator) és a CaMV (*Cauliflower mosaic virus*) 35S promoterét a pGWB402 (Nakagawa et al., 2007) vektorból PCR segítségével szaporítottuk fel.

2.4.1 A klónozások során használt baktérium törzsek és táptalajok

A klónozások során *E.coli* Top10 hőkompetens (Invitrogen), *E.coli* JM109 hőkompetens, valamint *A. tumefaciens* Agl1 törzseit használtuk. Az *Escherichia coli* transzformációkhoz LB (Lauria-Bertani) és SOC táptalajokat, az *Agrobacterium tumefaciens*-el végzett munkákhoz YEB (Yeast Extract Broth, Sambrook et al., 1989) táptalajt használtunk.

2.4.2 A kompetens sejtek elkészítése

A hőkompetens *E.coli* sejteket Inoue et al. (1990), az *A. tumefaciens* sejteket pedig Höfgen és Willmitzer (1988) módszere alapján készítettük el.

2.5 Bioinformatikai vizsgálatok

2.5.1 Nukleotid sorrend összehasonlítás és filogenetikai vizsgálatok

A CP gének elsődleges szerkezetének adatait BioEdit Sequence Alignment Editor programmal értékeltük ki, majd illesztettük a következő vizsgálatokhoz. A nukleinsav, illetve az *in silico* következtetett CP aminosav szekvencia adatokból ClustalX2.0.9 programmal elkészítettük a rokonságot jellemző törzsfát. A három különböző számítási módszerrel (neighbour-joining-NJ; Maximum parsimony-MP; maximum likelihood-ML) azonos eredményeket kaptunk, ezért a

rokonsági viszonyokat jellemző törzsfát az NJ módszer eredményei alapján állítottuk össze. A filogenetikai vizsgálatok során a statisztikai megbízhatóságot a Clustal X program 1000 ismétlést alkalmazó bootstrap analízise biztosította. A törzsfát NJplot (Perrière és Gouy, 1996) programmal jelenítettük meg.

Az MDMV rokonsági körének átlagos diverzitását és genetikai távolságát (p-distance) MEGA 4.0.2 programmal számítottuk ki (Kumar et al., 2008). A törzsfán szereplő szekvenciák hivatkozási számai megtalálhatóak az egyes számú mellékletben.

2.5.2 Rekombinációs vizsgálatok

Az általunk izolált és a nemzetközi adatbankokban megtalálható MDMV szekvenciákra épülő rekombinációs vizsgálatokhoz a TOPALi v2 (Milne et al., 2004) programcsomag PDM (Probabilistic Divergence Measures) analízisét, valamint a RDP3 v.3.44 (Recombination detection program, Martin et al., 2005; Heath et al., 2006) alkalmaztuk (ablak méret =500 nt, ablak elmozdulásának mérete =50 nt) 95%-os szignifikancia szinten.

2.5.3 RNS másodlagos szerkezet vizsgálatok

Az RNS másodlagos szerkezet, és RNS stabilitás vizsgálatokhoz ViennaRNA (Hofacker et al., 1994), NUPACK (Dirks és Pierce, 2004) és UNAFold (Markham és Zuker, 2008) programokat használtunk.

3 EREDMÉNYEK

3.1 Kukorica csikos mozaik vírus izolátumok gyűjtése és tüneteinek vizsgálata

Mintáinkat Martonvásáron és Szegeden, kukoricáról (*Zea mays* L. *convar. dentiformis*, *Zea mays* L. *convar. saccharata*), fenyércirokról (*Sorghum halepense* (L.) Pers) és szemes cirokról (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) gyűjtöttük.

A szántóföldről gyűjtött, különböző tüneteket mutató kukorica levélminták nedvével inokulált csemegekukoricán (*Zea mays* L. *convar. saccharata*, „Honey”) nem mutatkoztak eltérő tünetek, ebből arra következtethetünk, hogy MDMV esetében inkább a gazdanövény valamint a környezeti tényezők felelősek a különböző tünetek kialakításáért, mint a vírus köpenyfehérje génjének apróbb eltérései vagy a földrajzi elhelyezkedés. A négy év során gyűjtött mintáinkból összesen nyolcvanhat esetben sikerült az MDMV jelenlétét kimutatni PCR módszer segítségével.

SCMV és SrMV specifikus primerekkel azonban egyik évben sem sikerült vírust kimutatni, ez az eredmény teljesen megegyezik Achon et al. (2007) és Oertel et al. (1997) megállapításaival, miszerint Németországban az SCMV a dominánsan elterjedt egyszikűeket fertőző vírus, míg a többi európai országban az MDMV az uralkodó.

3.2 Pollenéletképesség vizsgálat

A fitotron kamrában nevelt, MDMV fertőzött és kontroll kukorica növények pollenéletképességét FDA festéssel vizsgáltuk. A pollenéletképességet százalékosan nem lehetett kiértékelni, mert az MDMV fertőzött növény mikrospóráinak csak a sejtfa volt látható, életképes pollent egyáltalán nem lehetett detektálni.

A vírusfertőzött kukoricák az internóduszok megrövidülése miatt fele olyan magasak voltak, mint a kontroll növények, címerük két héttel később fejlődött ki, és negyed akkora méretű volt. Az MDMV fertőzött kukoricák címereiből csak preparálással tudtuk kinyerni a mikrospórákat. Irodalmi adatok alapján elmondható, hogy eddig nem vizsgálták az MDMV, vagy bármely más, egyszikűeket fertőző potyvirus fertőzésének hatását a gazdanövény pollentermelő - illetve pollen - életképességére.

3.3 A kukorica csikos mozaik vírus rokonsági viszonyainak feltárása

A nukleinsav, illetve az *in silico* következtetett CP aminosav szekvencia adatokból elkészítettük a rokonsági viszonyokat ábrázoló törzsfát, amely összesen kilencvennégy MDMV izolátum szekvenciáját tartalmazza (Gell et al., 2010), ebből nyolc az NCBI génbank adatbázisból

származott. Ezen szekvenciák és regisztrációs számaik a következők: MDMV-Hungary-ScH/SYN (AJ542536), MDMV-Spain-M (AM110758), MDMV-Spain-Sp (AJ416645), MDMV-A (U07216) MDMV-Argentina-Arg (DQ973169), MDMV-Bulgarian-Bul (NC003377), MDMV-Royalty (AJ563726), MDMV-Bulgaria-Burgas (AM490848) .

A vizsgált izolátumok közti átlagos genetikai távolság 7,4% (p-distance-0.074). Ha a köpenyfehérje gén különböző régióit vizsgáljuk, akkor elmondható, hogy az N-terminális régió (1-204 nt) a legváltozékonyabb, átlagosan 12,2% a nukleotid sorrendben található eltérés. A C-terminális régióban (717-915 nt) 7,2%, míg a konzervált központi régióban (205-716 nt) összesen 5,2% az átlagos szekvencia eltérés. A 3' UTR (252 nt) genetikai távolsága 0-11,4%-ig változott, átlagosan 3,7%.

Különböző potyvírusok szerológiai és molekuláris vizsgálata alapján a kutatók két fő tényezőt határoztak meg, melyek nagy hatással lehetnek a köpenyfehérjére: az egyik a földrajzi eredet, a másik pedig a gazdanövény (Alegria et al., 2003; Xu et al., 2008). A kukorica csíkos mozaik vírus izolátumok rokonsági viszonyai és a genetikai távolságok alapján elmondható, hogy az SCMV alcsoport többi tagjával ellentétben, az MDMV izolátumai között sem földrajzi elhelyezkedés sem pedig gazdanövény alapján nem található szekvencia variánsok, a víruspopulációk hazai viszonyok között stabilnak tekinthetők.

Kivételt képez néhány martonvásári izolátum (Mv0702, Mv0801, Mv0811, Mv0814, Mv0905), melyek köpenyfehérjék N-terminális részén hordoznak 13 aminosav hosszúságú inszerciót. Az egyik martonvásári izolátumnál, melyet 2008-ban fenyércirokról gyűjtöttünk, az inszerció előtt 9 aminosav hosszúságú delécióval is rendelkezik. Ugyan ezt az inszerciót nukleinsav szinten (39nt). Az MDMV köpenyfehérje aminoterminális részén elhelyezkedő inszerciót már korábban leírták (Tóbiás és Palkovics, 2004), de ez az első eset, hogy az inszerció egy delécióval párosul. Inszerciók és deléciók más potyvírusok esetében is előfordulnak a köpenyfehérjének ebben a változékony régiójában, ilyen például TuMV/deléció (Lehmann et al., 1997), SCMV/inszerció (Oertel et al., 1997), DMV/inszerció (Pappu et al., 1994), SCMV (SCE alcsoport)/deléció (Alegria et al., 2003), SrMV/inszerció (Mirkov et al., 1997). A köpenyfehérje aminoterminális régiójában jelen levő inszerciók és deléciók alátámasztják a potyvírusok genomjának rugalmasságát és alkalmazkodó képességét, valamint előfordulásuk gyakorisága miatt arra lehet következtetni, hogy talán valamilyen funkcionális tulajdonsággal bírnak. Előfordulhat, hogy például erősebb kapcsolatot tudnak kialakítani a vektorokkal, vagy gyorsabb a sejtről-sejtre terjedésük, de a mai napig nem áll rendelkezésünkre információ ezekről a lehetőségekről. Az összehasonlító számítógépes vizsgálatok alapján az izolátumok egy részében talált inszert nagyfokú konzerváltságot mutat mind a nukleinsav bázissorrendjét mind elhelyezkedését tekintve. További számítógépes analízis alapján arra a

következtetésre jutottunk, hogy az inszerció szerepet játszik a vírus RNS stabilitásában (Petrik et al., 2010).

Az inszerciót tartalmazó izolátumok az adatbázisban megtalálható Argentin izolátummal külön csoportot alkotnak a rokonsági törzsfán. További érdekesség, hogy az összes inszerciót hordozó izolátumban a DAG aminosav motívum - mely a levéltetűvel való átvihetőségi factor - DVG-re változott. A rendelkezésünkre álló szekvenciák alapján úgy tűnik, hogy az inszerció és a DAG mutációja között összefüggés van, habár előfordul olyan izolátumban is, amely nem tartalmaz inszerciót (MDMV-AJ542536-HUN-Sc-Sc/H).

Kutatók több esetben bizonyították a potyvírusok DAG motívumában történő mutációk hatását a levéltetűvel való terjedésre (Shukla et al., 1991; Ullah et al., 2003; Farreyrol et al., 2006). Atreya et al. (1991) TVMV (*Tobacco vein mottling virus*) izolátumokon vizsgálták a DAG motívum mutációit. A kérdés az, hogy az Asp-Ala-Gly módosulása Asp-Val-Gly-re hatással van-e az MDMV levéltetűvel való terjedésére.

Az RNS vírusok körében jól ismert jelenség, hogy egy adott növényen belül a víruspopulációk variábilisak az állandó replikációs hibákból adódó változásoknak, mutációknak, rekombinációknak köszönhetően (quasispecies). Azért, hogy megvizsgáljuk az általunk leírt vírusizolátumok populációinak intraspecifikus struktúráját, két izolátum (Mv0702, Sz0612) esetében 8-8 klón szekvenciáját is meghatároztuk. Az Mv0702-es izolátum esetében 99-100% szekvencia homológiát találtunk, a Sz0612-es minta esetében 0,1-7,6% szekvencia eltérést tapasztaltunk. Ez a különbség azonban aminosav szinten nem mutatkozott meg, csak 0-3,1%-os volt. Tehát elmondható, hogy a vizsgált izolátumok populációi a növényen belül homogének voltak.

3.4 A vírus RNS másodlagos szerkezetének vizsgálata

A köpenyfehérje aminoterminális szakaszában talált inszerció és a DAG aminosav motívum mutációját más potyvírusok esetén is megfigyelték (ZeMV Seifers et al., 2000, MDMV Tóbiás és Palkovics, 2004). Az általuk vizsgált izolátumokban is úgy tűnt, hogy ez az inszerció egy duplikáció eredménye, azonban funkciójáról nem tudni sokat. Továbbá elég sok vírus RNS 5' és 3' másodlagos szerkezeten alapuló funkcionális vizsgálatot végeztek (McCormack et al., 2008), melyek szintén genom szinten rendezett RNS struktúrák (GORS- genome scale ordered RNA structures) alapján mutatták meg a különböző vírusnemzetségek közti szignifikáns eltéréseket (Simmonds et al., 2004). Vizsgálataik eredménye az lett, hogy a potyvírusok genomjából hiányoznak ezek az RNS struktúrák, valószínűleg az RNS nukleokapszid fehérjékkel való kapcsolata limitálja, vagy korlátozza ezeknek a szerkezeteknek a szükségét. Munkánk során az MDMV N-terminálisában megtalálható inszert RNS stabilitásra és másodlagos szerkezetre kifejtett hatását vizsgáltuk. Az általunk gyűjtött és az adatbázisban megtalálható MDMV köpenyfehérje

gének becsült másodlagos RNS szerkezetét elkészítettük három különböző programmal, Vienna RNA csomag (Hofacker et al., 1994), UNAFold (Markham et al., 2008) és NUPACK (Dirks és Pierce, 2004). A Vienna és az UNAFold programok egyaránt a Zuker-algoritmussal számolnak (Zuker és Stiegler, 1981), míg a NUPACK lehetőséget ad az úgynevezett pseudknot (álcsomó) RNS szerkezet vizsgálatokra is.

A vizsgálatok alapján elmondható, hogy az inszerciót tartalmazó izolátumok legkisebb szabadenergiája (MFE, minimum free energy) alacsonyabb, mint azok melyek nem tartalmazzák ezeket a szekvenciákat. A random szekvenciák utáni értékek (867, 876, 915) a vizsgált köpenyfehérje gének hosszúságát jelölik. A hazai izolátumok hosszúsága 876bp, a Spanyol izolátumoké 867bp, míg az inszerciót tartalmazóké 915bp volt. Az inszerciót tartalmazó izolátumok átlagosan 7,7 %-al alacsonyabb MFE értékkel rendelkeznek, mint a 915bp hosszúságú random inszerciót tartalmazó szekvenciák, míg az inszerciót tartalmazó szekvenciák legkisebb szabadenergiája 7,2 %-al alacsonyabb, mint az inszerciót nem tartalmazóak. A statisztikailag szignifikáns különbségek számításához ANOVA tesztet készítettünk.

Az RNS másodlagos szerkezet vírus replikációban betöltött szerepe jól ismert (Simmonds et al., 2004), így előfordulhat, hogy az inszerció hatására van a vírus replikációjára azáltal, hogy stabilabb másodlagos szerkezetet alakít ki.

A vírus RNS másodlagos szerkezete alapján elmondható, hogy az MDMV köpenyfehérje génjének N-terminális szakaszában megtalálható inszerció stabilizálja a molekul szerkezetet, az alacsonyabb MFE (minimum free energy) értékekhez, kevesebb elágazással rendelkező molekul szerkezet kapcsolódik.

3.5 Rekombinációs vizsgálatok

Az kukorica csíkos mozaik vírus köpenyfehérje génjében, TOPALi V2 programjával végzett vizsgálata alapján nem találtunk rekombinációs helyet sem az izolátumok között, sem pedig a rokon vírusok izolátumaival. Az általunk meghatározott két teljes hosszúságú vírusizolátum (MV0801-M, Sz-0605-M) és az adatbázisban megtalálható három teljes hosszúságú MDMV szekvencia (NC_003377.1; AM110758, AJ001691) vizsgálata során a P3-as fehérjét kódoló régióban találtunk egy rekombinációs töréspontot 2951nt-nél. Az első szakasz alapján (1-2951nt) az izolátumokat földrajzi eredet szerint csoportosulnak, míg a második szakasz (2951-9563nt) az Mv0801-M izolátum az Sp izolátummal mutat közeli rokonságot. Tehát érdemes megemlíteni, hogy bár a köpenyfehérjét kódoló régió meglehetősen homológ, földrajzi eredettől és gazdanövénytől függetlenül, addig a potyvírusok legváltozékonyabb, P3 fehérjét kódoló régiójában található rekombinációs pont az MDMV-re jellemző.

Rekombinációs vizsgálatainkat ezután elvégeztük az RDP3 (Recombination Detection Program) programmal, mellyel a teljes hosszúságú MDMV izolátumokat valamint az SCMV alcsoport köpenyfehérjéj kódoló szakaszait vizsgáltuk. Az RDP egyszerre kilenc különböző algoritmust futtat (RDP, GENECONV, Boot Scan, MaxChi, Chimaera, SiScan, Phylpro, LARD, 3Seq), melyek közül mind mást hanyagol el és másra fekteti a hangsúlyt. A programot napjainkban leginkább HIV (*Human immunodeficiency virus*) rekombinációs változatok kutatására használják, azonban tapasztalataink szerint a potyvírusok ilyen típusú vizsgálatához is kiválóan alkalmazható. A program az öt teljes hosszúságú MDMV szekvenciában (AM110758-Spain, NC_003377-Bulgaria, AJ001691-Bulgaria, Mv0801-M, Sz0605-M) négy rekombinációs eseményt talált, melyeket eddig nem írtak le. Az SCMV alcsoport tagjai közül SCMV-SCMV, SrMV-SrMV, JGMV-MDMV (70-210), MDMV-MDMV, SrMV-MDMV (329-397) izolátumok között találtunk rekombinációs eseményeket a köpenyfehérje kódoló régiójában. Az RDP programmal számos rekombinációs eseményt sikerült detektálni, míg a TOPALi csak egyetlen töréspontot talált a teljes hosszúságú MDMV genomban.

3.6 A teljes genomot lefedő nukleotid sorrend meghatározása

A teljes MDMV genomot lefedő szekvenciák meghatározásához egymással átfedő vírus szakaszokat klónoztunk, majd szekvenáltuk. A kapott elektroferogramokat a BioEdit Sequence Alignment Editor programmal jelenítettük meg, majd a génbanki adatbázisban megtalálható szekvenciákkal illesztettük. Az így kapott szekvencia illesztésből összeállítottuk a teljes hosszúságú szekvenciákat a Sz0605 (Szeged), és a Mv0801-es (Martonvásár) izolátumok esetében. CloneManager program segítségével megvizsgáltuk a teljes genom restriktions mintázatát, majd ennek alapján terveztük meg a teljes hosszúságú klón elkészítését.

3.7 MDMV vírusrezisztencia kiváltására alkalmas konstrukció elkészítése

A kockázati tényezők csökkentése az általunk tervezett konstrukcióban a következők voltak: a vírusszekvencia nem íródik át fehérjévé a transzlációs start kodon hiánya miatt; nem tartalmazza a köpenyfehérje N-terminális régiójában a DAG motívumot kódoló régiót; mely a levéltetvekkkel való vírusátvitelhez nélkülözhetetlen, ezért egy esetleges levéltetűvel nem terjedő vírus felülfertőzése esetén, annak vektorkörét nem bővíti; a rezisztencia PTGS alapú, így nem halmozódik fel a transzgénről származó RNS (Tepfer és Balázs, 1997); a növényi transzformációs vektor az ampicillin rezisztencia gént a határszekvenciákon kívül tartalmazza, így lehetőséget ad a baktériumok pozitív szelekciójára, azonban a növényeknek nem adja át azt. A vírusrezisztencia kiváltására alkalmas konstrukció a géncsendesítés elvén működik, a hajtű (hairpin) konstrukcióban a

vírus csonkított köpenyfehérje gén szakasza fordított ismétlődés formájában van jelen, melyeket egy rizs intron választ el egymástól. A vírusszekvenciák egymással komplementerek, így az intron kivágódása (splicing) után kettősszalú RNS molekulák képződnek, melyekből az MDMV specifikus siRNS-ek a PTGS elicitorai lesznek.

A növényi transzformálások és a potenciálisan transzformáns kukorica növények felnevelése folyamatban van, sajnos a különböző kukorica fajták és vonalak nagyon nagy különbségeket mutatnak regenerációs készségében, így a továbbiakban a megfelelő transzformációs-és regenerációs módszerek kidolgozására kell törekednünk

3.8 A kukorica csíkos mozaik vírus teljes hosszúságú cDNS klónjának elkészítése

A kukorica csíkos mozaik vírus teljes hosszúságú klónját az Mv0801-M izolátumból készítettük el. Az SCMV alcsoport tagjai közül a mai napig csak a JGMV (*Johnsongrass mosaic virus*) esetében készült el teljes hosszúságú, fertőzőképes cDNS klón (Kim et al., 2003). Fertőzőképes cDNS klónokat kutatók már sok esetben sikeresen előállítottak (PPV-Maiss et al., 1992; LMV Yang et al., 1998; TuMV Sánchez et al., 1997; ZYMV Gal-on et al., 1991; PSbMV Johansen, 1996), azonban a mai napig vannak bizonyos potyvírusok, melyek cDNS klónjaival hosszú évekig tartó kísérletezés után sem tudtak fertőzést előidézni. Ennek okai a lehetnek a következők: A poliadenilációs szignál hiánya, vagy rövidege; egy-két bázis hibás a vírus 5' végén, mely a fertőzőképesség teljes elvesztéséhez vezethet; az inszerciók a vírusgenom instabilitását okozhatják, DNS minősége és mennyisége, a gazdanövény, az inokulálás típusa (manuális, Agrobaktérium közvetített, belövéses).

Sajnos tizenkét különböző tisztításból származó teljes hosszúságú cDNS klón egyikével sem sikerült fertőzést kiváltanunk, a kukoricák teljesen tünetmentesek voltak. A fitotron kamra hőmérséklet és fény intenzitása beállításai optimálisak voltak a kukorica neveléséhez valamint a vírus tünetek kifejlődéséhez, amint ez a pozitív kontroll növényeken látható volt. A kukoricákból ezután RNS-t vontunk ki és a PCR analízis alapján sem találtunk kukorica csíkos mozaik vírust az inokulált növényekben.

4 MEGVITATÁS (KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK)

A kukoricatermesztés jelentősége hazánkban igen nagy, fontos a humán táplálkozásban betöltött szerepe, haszonállataink takarmányozásához pedig nélkülözhetetlen. Az nagymértékben terjedő bioetanol gyártás következtében ipari felhasználása is egyre jelentősebb. A kukorica vírusos megbetegedései közül az MDMV az egyik legjelentősebb kórokozó, mely nagy termésvesztéseket okozhat. Ezért nagyon fontos a vírus rezervoár gyomok irtása, valamint a levéltetű vektorok elleni védekezés.

2006-2009-ig terjedő időszakban, szántóföldi kukorica, cirok és fenyércirok levélmintákból származó RNS-ek PCR vizsgálatai alapján elmondható, hogy hazánkban az adott termőhelyeken az SCMV alcsoport tagjai közül az MDMV a dominánsan előforduló vírus.

A négy év során vizsgálatainkba bevont kukorica csíkos mozaik vírus izolátumok köpenyfehérje génjének elsődleges szerkezete alapján elmondhatjuk, hogy az MDMV genetikai állománya nem mutat jelentékeny változékonyságot. A víruspopuláció hazánkban, és a világ más részein is stabilnak mondható.

Vizsgálataink során bebizonyosodott, hogy az MDMV fertőzés nem csak a kukoricacsó méretének, szemtermésének, valamint címer méretének csökkenését okozza, hanem a minimális megtermelt pollen életképességét is nagyban befolyásolja.

Az általunk meghatározott 86 MDMV köpenyfehérje gén, valamint az adatbázisban megtalálható MDMV szekvenciák vizsgálata alapján elmondható, hogy a csonkított köpenyfehérje géntől származtatott vírusrezisztencia áttörésének lehetősége MDMV esetében alacsony, mivel a populáció homogénnek bizonyult, és a nukleotid sorrendben előforduló különbségek általában nem jelentettek aminosav szintű különbségeket.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Munkánk során, négy egymást követő évben (2006-2009) meghatároztunk 86 MDMV izolátum részleges N1b és teljes köpenyfehérje génjének elsődleges szerkezetét, ezzel nagy méretekben bővítettük a génbanki adatbázis MDMV szekvencia gyűjteményét.
2. Az izolátumokat azonos gazdanövényen, azonos környezeti körülmények között tesztelve megállapítottuk, hogy a szántóföldi körülmények között eltérő tüneteket mutató MDMV izolátumok között valójában nincsenek tüneti különbségek. Ez visszavezethető, a gazdanövényre, a hőmérsékleti különbségekre, melyek nagyban befolyásolják a vírustünetek kialakulását, valamint arra, hogy milyen fenofázisban fertőződött meg a növény.
3. A meghatározott szekvenciákból elkészítettük az MDMV rokonsági viszonyait jellemző törzsfát, kiegészítve az adatbázisban megtalálható szekvenciákkal. Ez az első, ekkora mintaszámot feldolgozó, köpenyfehérje gén elsődleges szerkezetén alapuló MDMV rokonsági viszonyait feltáró vizsgálat.
4. Először írtunk le egy olyan MDMV köpenyfehérje gent (Mv0811, FM883174), mely az N-terminális részén található inszerció mellett tartalmaz egy deléciót is.
5. Az inszerciót tartalmazó izolátumok elsődleges szerkezetéből, három különböző számítógépes program számításai alapján RNS stabilitás és RNS másodlagos szerkezet vizsgálatokat végeztünk, melynek eredményei rávilágítottak arra, hogy a köpenyfehérje gén változékony N-terminális régiójában előforduló inszerciók hatással lehetnek az RNS másodlagos szerkezetének stabilizálásában.
6. Meghatároztuk két, földrajzilag elkülönülő helyről izolált kukorica csíkos mozaik vírus teljes szekvenciáját (Mv0801-es és a Sz0605-ös izolátumok).
7. Elkészítettünk egy géncsendesítésen alapuló, MDMV rezisztencia kiváltására alkalmas konstrukciót, mely a kukorica csíkos mozaik vírus csonkított köpenyfehérjéjét tartalmazza.
8. Bebizonyítottuk, hogy a háromleveles fejlődési stádiumban, MDMV-vel megfertőzött csemegekukoricának nemcsak pollentermelése hanem pollen-életképessége is nagymértékben lecsökken. Ez az első ilyen jellegű adat egyszikű növényt fertőző potyvirus fertőzések estében.
9. Rekombinációs vizsgálataink alapján elmondható, hogy az MDMV genomjára jellemzőek az intermolekuláris átrendeződések. Valamint a köpenyfehérjét kódoló régiójában az SCMV alcsoportba tartozó vírusokkal is előfordulnak rekombinációs események

IRODALOMJEGYZÉK

- ACHON, M.A., SERRANO, L., ALONSO-DUEÑAS, N., PORTA, C. (2007): Complete genome sequences of Maize dwarf mosaic and Sugarcane mosaic virus isolates coinfecting maize in Spain. *Arch. Virol.*, 152 (11): 2073-2078.
- ALEGRIA, O.M., ROYER, M., BOUSALEM, M., CHATENET, M., PETERSCHMITT, M., GIRARD, J.C., ROTT, P. (2003): Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six sugarcane mosaic virus isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. *Arch. Virol.*, 148(2): 357-72.
- ATREYA, P.L., ATREYA, C.D., PIRONE, T.P. (1991): Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7887-7891.
- CHRISTENSEN, A.H., QUAIL, P.H. (1996): Ubiquitin promoter-based vectors for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.*, 5:213-218.
- DIRKS, R.M., PIERCE, N.A. (2004): An algorithm for computing nucleic acid base-pairing probabilities including pseudoknots. *J. Comput. Chem.*, 25: 1295-1304.
- FARREYROL, K., PEARSON, M.N., GRISONI, M., COHEN, D., BECK, D. (2006): Mosaic virus isolates from French Polynesia and the Cook Islands are Dasheen mosaic virus strains that exclusively infect vanilla. *Arch. Virol.*, 151 (5): 905-919.
- GAL-ON, A., ANTIGNUS, Y., ROSNER, A., RACCAH, B. (1991): Infectious in vitro RNA transcripts derived from cloned cDNA of the cucurbit potyvirus, zucchini yellow mosaicvirus. *J. Gen. Virol.*, 72: 2639-2643.
- GELL, G., BALÁZS, E., PETRIK, K. (2010): Genetic diversity of Hungarian Maize dwarf mosaic virus isolates. *Virus Genes*, 40: 277-281.
- HEATH, L., VAN DER WALT, E., VARSANI, A., MARTIN D.P. (2006): Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J. Virol.*, 80: 11827-11832.
- HILL, J.H., MARTINSON, C.A., RUSSEL, W.A. (1974): Seed Transmission of Maize Dwarf Mosaic and Wheat Streak Mosaic Viruses in Maize and Response of Inbred Lines1. *Crop Sci.*, 14: 232-235.
- HOFACKER, I.L., FONTANA, W., STADLER, P.F., BONHOFFER, S., TACKER, M., SCHUSTER, P. (1994): Fast folding and comparison of RNA secondary structures (the Vienna RNA Package). *Monaths. Chem.*, 125: 167-188.
- HÖFGEN, R., WILLMITZER, L. (1988): Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucl. Acids Res.*, 20: 9877.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990): High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96 (1): 23-28.
- JANSON, B.F., ELLETT, C.W. (1963): A new corn disease in Ohio. *Plant Dis. Rep.*, 47: 1107-1108.
- JOHANSEN, I. E. (1996): Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 12400-12405.
- KIM, K.S., OH, H.Y., SURANTO, S., NURHAYATI, E., GOUGH, K.H., SHUKLA, D.D., PALLAGHY, C.K. (2003): Infectivity of *in vitro* transcripts of Johnsongrass mosaic potyvirus full-length cDNA clones in maize and sorghum. *Arch. Virol.*, 148: 563-574.
- KUMAR, S., NEI, M., DUDLEY, J., TAMURA, K. (2008): MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinform.*, 9 (4): 299-306.
- LEHMANN, P., PETRZIK, K., JENNER, C., GREENLAND, A., SPAK, J., KOZUBEK, E., WALSH, J.A. (1997): Nucleotide and amino acid variation in the coat protein coding region of turnip mosaic virus isolates and possible involvement in the interaction with the brassica resistance gene TuRB01. *Physiol. Mol. Plant. Path.*, (51): 195-208.
- MAISS, E., TIMPE, U., BRISKE-RODE, A., LESEMANN, D.-E., CASPER, R. (1992): Infectious in vivo transcripts of a plum pox potyvirus full-length cDNA clone containing the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. *J. Gen. Virol.*, 73: 709-713.
- MARKHAM, N.R., ZUKER, M. (2008): UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. *Methods Mol. Biol.*, 453: 3-31.
- MARTIN, D.P., WILLIAMSON, C., POSADA, D. (2005): RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics*, 21: 260-262.
- McCORMACK, J.C., YUAN, X., YINGLING, Y.G. ZAMORA, R.E., SHAPIRO, B.A., SIMON, A.E. (2008): Structural Domains within the 3' Untranslated Region of Turnip Crinkle Virus. *J. Virol.*, 82: 8706-8720.
- McELROY, D., BLOWERS, A.D., JENES, B., WU, R. (1991): Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 231: 150-160.
- MIKEL, M.A., D'ARCY, C.J., FORD, R.E. (1984): Seed transmission of maize dwarf mosaic virus in sweet corn. *J. Phytopathol.*, 110: 185-191.
- MILNE, I., WRIGHT, F., ROWE, G., MARSHALL, D.F., HUSHMEIER, D., MCGUIRE, G. (2004): TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics*, 20: 1806-1807.
- MIRKOV, T.E., YANG, Z.N. (1997): Sequence and relationships of Sugarcane Mosaic and Sorghum Mosaic Virus strains, and development of RT-PCR based RFLPs for strain discrimination. *Phytopathology*, 87: 932-939.

- NAKAGAWA, T., SUZUKI, T., MURATA, S., NAKAMURA, S., HINO, T., MAEO, K., TABATA, R., KAWAI, T., TANAKA, K., NIWA, Y., WATANABE, Y., NAKAMURA, K., KIMURA, T., ISHIGURO, S. (2007): Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (8): 2095-2100.
- OERTEL, U., SCHUBERT, J., FUCHS, E. (1997): Sequence comparison of the 3'-terminal parts of the RNA of four German isolates of sugarcane mosaic potyvirus (SCMV). *Arch. Virol.* 142: 675-687.
- PAPPU, S.S., PAPPU, H.R., RYBICKI, E.P., NIBLETT, C.L. (1994): Unusual amino-terminal sequence repeat characterizes the capsid protein of dasheen mosaic potyvirus. *J. Gen. Virol.*, 75: 239-242.
- PERRIÈRE, G., GOUY, M. (1996): WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, 78: 364-369.
- PETI, J. (1983): A kukorica csíkos mozaik vírus kártételének vizsgálata 24 kukoricahibriden. *Növényvédelem*, 19: 18-25.
- PETRIK, K., SEBESTYÉN, E., GELL, G., BALÁZS, E. (2010): Natural insertions within the N-terminal region of the coat protein of *Maize dwarf mosaic potyvirus* (MDMV) have an effect on the RNA stability. *Virus Genes*, 40: 135-139.
- REVERS, F., LE GALL, O., CANDRESSE, T., MAULE, A.J. (1999): New Advances in Understanding the Molecular Biology of Plant/Potyvirus Interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12 (5): 367-376.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning: A Laboratory Manual, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SÁNCHEZ, F., MARTÍNEZ-HERERRA, D., AGUILAR, I., PONZ, F. (1998): Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Res.*, 55: 207-219.
- SEIFERS, D.L., SALOMON, R., MARIE-JEANNE, V., ALLIOT, B., SIGNORET, P., HABER, S., LOBODA, A., ENS, W., SHE, Y.M., STANDING, K.G. (2000): Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. *Phytopathology*, 90: 505-513.
- SHUKLA, D.D., FRENKEL, M.J., WARD, C.W. (1991): Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Can. J. Plant Pathol.*, 13: 178-191.
- SIMMONDS, P., TUPLIN, A., EVANS, D.J. (2004): Detection of genome-scale ordered RNA structure (GORS) in genomes of positive-stranded RNA viruses: Implications for virus evolution and host persistence. *RNA*, 10: 1337-1351.
- SUM, I., SEBESTYÉN, E., PAPP, I., LISZT, A. (1979): A kukorica törpe mozaik vírus hatása 15 kukoricahibridre. *Növénytermelés*, 28: 309-315.
- SZIRMAI, J., PAIZS, L.-NÉ (1963): A kukorica csíkos mozaik betegsége. *Növénytermelés*, 12: 43-50.
- SZIRMAI, J. (1968): The occurrence of stripe mosaic disease of maize in Hungary and possibilities of breeding for virus resistance. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.*, 3: 189-198.
- TEPFER, M., BALAZS, E. (editors) (1997): *Virus-Resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact*. Versailles & Heidelberg: INRA & Springer-Verlag.
- TOLER, R.W. (1985): Maize Dwarf Mosaic, the Most Important Virus Disease of Sorghum. *Plant Dis.*, 69: 1011-1015.
- TÓBIÁS, I., PALKOVICS, L., PERECZES J. (2003): A kukorica törpe mozaik vírus előfordulása csemegekukoricán. *Növényvédelem*, 39 (6): 247-250.
- TÓBIÁS, I., PALKOVICS, L. (2004): An unusual feature at the N-terminal end of the coat protein of Maize dwarf mosaic virus isolated in Hungary. *J. Phytopathol.*, 152: 445-447.
- TOLDINÉ TÓTH, É. (2008): A vírusfertőzöttség hatása egy kukoricahibrid termésére. *Növényvédelmi Tudományos Napok, Absztrakt*. 18.
- ULLAH, Z., CHAI, B., HAMMAR, S., RACCAH, B., GAL-ON, A., GRUMAT, R. (2003): Effect of substitution of the amino termini of the coat proteins of distinct potyvirus species on viral infectivity and host specificity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 63: 129-139.
- WIDHOLM, J. M. (1972): The use of fluoresceine diacetate and phenosaphranin for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.*, 47: 189-194.
- WILLIAMS, L.E., ALEXANDER, L.J. (1965): Maize dwarf mosaic virus, a new corn disease. *Phytopathology*, 58: 802-804.
- XU, D.L., PARK, J.W., MIRKOV, T.E., ZHOU, G.H. (2008): Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China. *Arch. Virol.*, 153(6): 1031-1039.
- YANG, S.J., REVERS, F., SOUCHE, S., LOT, H., LE GALL, O., CANDRESSE, T., DUNEZ, J. (1998): Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants *Arch. Virol.*, 143: 2443-2451.
- ZUKER, M., STIEGLER, P. (1981): Optimal computer folding of larger RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucl. Acids Res.*, 9: 133-148.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Folyóiratban megjelent közlemények:

- Gell, G.**, Balázs, E. and Petrik, K. (2010): Genetic diversity of Hungarian *Maize dwarf mosaic virus* isolates. *Virus Genes*. 40: 277-281. **IF: 1,706.**
- Petrik, K., Sebestyén, E., **Gell, G.** and Balázs, E. (2010): Natural insertions within the N-terminal region of the coat protein of *Maize dwarf mosaic potyvirus* (MDMV) have an effect on the RNA stability. *Virus Genes*. 40: 135-139. **IF: 1,706.**
- Gell, Gy.**, Petrik, K., Sebestyén, E. és Balázs, E. (2010). Kukorica csíkos mozaik vírus (MDMV) populáció jellemzése két kukoricatermesztő területen. *Növénytermelés*. 59 (4): 19-29.
- Gell, G.**, Petrik, K., Balázs, E. (2011). Unique sequence variant in the CP region of a MDMV isolate. *Acta Phytopathol. Entomol.* 46 (1): 11-15.
- Gell Gy.**, Petrik K. , Balázs E. és Divéki Z. (2008): Kukorica csíkos mozaik vírus (MDMV) populációk molekuláris analízise. *Növényvédelem*. 44 (11): 567-571.

Tudományos előadások, poszterek:

- Gell, G.**, Petrik, K. and Balázs, E. (2008): Genetic diversity of *Maize dwarf mosaic potyvirus* (MDMV) in Hungary. MMT 2008. évi Nagygyűlése, 2008 október 14-17, Keszthely. (poszter)
- Petrik, K., **Gell, G.**, Divéki, Z. and Balázs, E. (2008): Genetic variability and recombination events of *Maize dwarf mosaic potyvirus* (MDMV). IUMS 2008 Istanbul, XIV. International Congress of Virology, 10-15 August 2008, Istanbul. (poszter)
- Balázs, E., Petrik, K., **Gell, G.**, Divéki, Z. (2008): Recombination studies of *Maize dwarf mosaic potyvirus* (MDMV) as an important factor for risk assessment in maize plants. 10th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, 16-21 November 2008, Wellington, New Zealand. (poszter)
- Gell Gy.**, Petrik K., Balázs E. és Divéki Z. (2008): Kukorica csíkos mozaik vírus (MDMV) populációk molekuláris analízise. 54. NÖVÉNYVÉDELMI TUDOMÁNYOS NAPOK. (előadás)

Az értekezéshez szorosan nem tartozó közlemények és előadások jegyzéke:

- Bakó, A., **Gell, Gy.**, Balázs, E. (2010) Quantification of transgene expression in maize (*Zea mays* L.) throughout the vegetation period. *Plant Breeding*. 130: 41-45. **IF: 1,026.**
- Gell, G.**, Bakó, A., Spitzkó, T., Pintér, J. and Balázs, E.: Monitoring of transgene expression in maize during the vegetation period. PPBA, Experiences with GMP field trials and combating climate change challenges with green biotechnology. July 4-7, 2010-Kolozsvár, Romania.
- Gell, G.**, Bakó, A., Spitzkó, T., Pintér, J. and Balázs, E.: Monitoring of transgene expression in maize during the vegetation period. In: 8th International Symposium in the Series RECENT ADVANCES IN PLANT BIOTECHNOLOGY: NEW DEVELOPMENTS IN GREEN GENE TECHNOLOGY Szeptember 1-4, 2009 - Szeged p. 53. (poszter)
- Pánczél, S., **Gell, Gy.**, Mészáros, A., Balázs, E. 2009. Regenerációs és transzformációs kísérletek különböző olajtök (*Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*) genotípusokkal. Lippai János – Ormos Imre –Vas Károly Tudományos Ülésszak, Corvinus Egyetem, Budapest, október 28-30. Abstracts pp. 48-49.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm Dr. Balázs Ervin akadémikusnak, az MTA-MGKI Alkalmazott Genomikai Osztály vezetőjének munkámban nyújtott útmutatását, szakmai irányítását, valamint, hogy biztosította számomra, hogy kutatásaimat jól felszerelt laboratóriumában végezhettem.

Szeretném megköszönni Dr. Petrik Kathrinnak az együtt töltött évek során átadott tapasztalatokért, segítőkész munkájáért.

Nagyon köszönöm Dr. Divéki Zoltánnak, tudományos munkatársnak munkám során nyújtott segítségét, értékes tanácsait.

Köszönettel tartozom Dr. Hornok László akadémikusnak, munkám nyomon követéséért és segítőkészségéért.

Szeretném megköszönni Sebestyén Endre PhD hallgatónak, hogy idejét nem sajnálva segítségemre volt minden bioinformatikai kérdés megoldásában.

Köszönöm szépen Dr. Mészáros Annamária kukorica transzformálás terén végzett kísérleteit.

Köszönettel tartozom Dr. Spitkó Tamás és Pók István PhD hallgatónak, valamint Dr. Tóth Évának a Szegedi Gabonakutató Kht. munkatársának a mintagyűjtésekben való segítségükért.

Köszönettel tartozom Dr. Darkó Évának, a pollen-életképesség vizsgálatokban nyújtott segítségéért.

Köszönöm Fábán Attila PhD hallgatónak az elektronmikroszkópos képek elkészítésénél nyújtott segítségét.

Nagyon köszönöm laboratóriumunk asszisztensének, Babirák Teréznek a gondos és lelkiismeretes technikai segítségéért.

Valamint köszönöm az osztály összes dolgozójának, kiemelten Bakó Ambrusnak, Juhász Angélának és Soós Vilmosnak, hogy munkámat családi légkörben végezhettem velük.